

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08059503 A**

(43) Date of publication of application: **05 . 03 . 96**

(51) Int. Cl

**A61K 38/22**  
**A61K 38/22**  
**A61K 9/127**  
**A61K 38/00**  
**A61K 38/28**  
**A61K 38/26**  
**A61K 38/23**  
**A61K 38/11**  
**A61K 38/27**  
**A61K 38/04**  
**A61K 38/21**  
**A61K 39/00**  
**A61K 47/20**  
**A61K 47/42**

(21) Application number: **06202132**

(22) Date of filing: **26 . 08 . 94**

(71) Applicant: **TEIJIN LTD**

(72) Inventor: **KATAYAMA TAKESHI**  
**MACHIDA RYOJI**  
**NAGAI TSUNEJI**

(54) **LIPOSOME PREPARATION FOR ADMINISTERING  
PEPTIDE OR PROTEIN MEDICINE THROUGH  
MOUTH OR MUCOSA**

(57) Abstract:

**PURPOSE:** To obtain a liposome preparation containing a peptide or protein medicine and excellent in absorbability and persistence.

**CONSTITUTION:** The liposome preparation for oral or mucosal administration contains one or more single layered liposomes and/or multilayered liposomes (inner-sealed liposomes) and, if necessary, an absorption-stimulating agent, preferably a

protease-inhibiting agent, in a single layered liposome and/or a multilayered liposome (exodermis liposome), and contains a peptide or protein medicine or a vaccine in the inner-sealed liposomes. Examples of the peptide or protein medicine includes a calcitonin compound, an insulin compound, a growth hormone-releasing hormone, a corpus-forming hormone-releasing hormone and a parathyroid hormone, and the vaccine includes an influenza vaccine, diphtheria vaccine, a tetanus vaccine and a pertussis vaccine. The amount of the peptide or protein medicine or vaccine is preferably 2-10 times that used for their injection administration.

**COPYRIGHT: (C)1996,JPO**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-59503

(43) 公開日 平成8年(1996)3月5日

(51) Int.Cl.<sup>9</sup>  
A 6 1 K 38/22

識別記号  
AED

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

9/127

L

A 6 1 K 37/ 24

AED

37/ 02

審査請求 未請求 請求項の数6 O L (全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-202132

(22) 出願日 平成6年(1994)8月26日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成6年3月5日、  
日本薬学会第114年会組織委員会発行の「日本薬学会第  
114年会講演要旨集4」に発表

(71) 出願人 000003001

帝人株式会社

大阪府大阪市中央区南本町1丁目6番7号

(72) 発明者 片山 健

静岡県清水市村松1-4-78

(72) 発明者 町田 良治

神奈川県鎌倉市岡本1241-4 鎌倉ロジュ  
マンC-401

(72) 発明者 永井 恒司

東京都文京区本駒込1-23-10-103

(74) 代理人 弁理士 前田 純博

(54) 【発明の名称】 ペプチド・蛋白質性薬物の経口、経粘膜投与用リポソーム製剤

(57) 【要約】

【目的】 ペプチド・蛋白質性薬物を含有する吸収率、持  
続性に優れたリポソーム製剤を提供する。

【構成】 1枚膜リポソームおよび/または多重層リポソ  
ーム(外皮リポソーム)中に、1以上の1枚膜リポソ  
ームおよび/または多重層リポソーム(内封リポソ  
ーム)、および必要に応じて吸収促進剤を含み、かつ内封  
リポソーム中にペプチド・蛋白質性薬物またはワクチン  
を含んでなる経口投与または経粘膜投与用リポソーム製  
剤。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 1枚膜リポソームおよび／または多重層リポソーム（外皮リポソーム）中に、1以上の1枚膜リポソームおよび／または多重層リポソーム（内封リポソーム）、および必要に応じて吸収促進剤を含み、かつ内封リポソーム中にペプチド・蛋白質性薬物またはワクチンを含んでなる経口投与または経粘膜投与用リポソーム製剤。

【請求項2】 ペプチド・蛋白質性薬物が、カルシトニン類、インスリン類、グルカゴン、成長ホルモン、成長ホルモン放出ホルモン類、ソマトスタチン類、成長ホルモン放出因子、エンケファリン類、黄体形成ホルモン放出ホルモン類、インスリン様成長因子類、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、バソプレッシン類、心房性ナトリウム利尿ペプチド、インターフェロン類、インターロイキン類、エリスロポエチン、顆粒球コロニー形成刺激因子、マクロファージ形成刺激因子、副甲状腺ホルモン類、副甲状腺ホルモン放出ホルモン、オキシトシン、プロラクチン、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモンよりなる群から選ばれる1種以上のペプチド・蛋白質性薬物である請求項1記載のリポソーム製剤。

【請求項3】 ペプチド・蛋白質性薬物が、カルシトニン類、インスリン類、成長ホルモン放出ホルモン類、黄体形成ホルモン放出ホルモン類、副甲状腺ホルモン類よりなる群から選ばれる1種以上のペプチド・蛋白質性薬物である請求項1記載のリポソーム製剤。

【請求項4】 ワクチンが、インフルエンザワクチン、ジフテリアワクチン、破傷風ワクチンまたは百日咳ワクチンである請求項1記載のリポソーム製剤。

【請求項5】 吸収促進剤が蛋白分解酵素阻害剤である請求項1記載のリポソーム製剤。

【請求項6】 蛋白質分解酵素阻害剤が、アプロチニン、メシル酸ガベキサート、メシル酸カモスタット、メシル酸ナファモスタット、大豆トリプシンインヒビター、 $\alpha$ 2マクログロブリン、キモスタチンよりなる群から選ばれる1種以上の蛋白分解酵素阻害剤である請求項5記載のリポソーム製剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、1枚膜リポソームおよび／または多重層リポソーム（外皮リポソーム）中に、1つ以上の1枚膜リポソームおよび／または多重層リポソーム（内封リポソーム）、および必要に応じて吸収促進剤を含み、かつ内封リポソーム中にペプチド・蛋白質性薬物またはワクチンを含んでなる経口投与または経粘膜投与用リポソーム製剤に関する。

## 【0002】

【従来の技術】現在知られているリポソームは、同心円上の数枚の膜からなる多重層リポソーム（MLV；multilamellar vesicle）、同心円上の2から4枚の膜から

なるオリゴ多重層リポソーム（OLV；oligolamellar vesicle）、MLVをさらに安定化させたリポソーム（SPLV；stable plurilamellar vesicle）、同心円上にない不規則な数枚の膜からなるリポソーム（MVV；Multivesicular vesicle）、小さな1枚膜リポソーム（SUV；small unilamellar vesicle）、大きな1枚膜リポソーム（LUV；large unilamellar vesicle）等に大別される。生体膜由来の脂質の利用が可能であり生体に安全であること、生体膜と類似した構造であり細胞レベルでの相互作用においても自然であると考えられること、高分子の内封が可能であることなどの理由から、リポソームは薬物のキャリアーとして勢力的に研究なされている。リポソームのキャリアーとしての利用法の一つとして、消化管からの吸収性の低い薬物の為の経口投与用製剤の研究が挙げられる。これらは主に、最も調製し易いMLVリポソームやSUVリポソームにより検討され、通常経口投与では無効とされていたインスリン（白根研介ら 日本小児科学会雑誌 91(6) 1506-1508 1987）、ヘパリン（上野雅晴ら、薬理学 47(1)56-60 1987）等が経口投与により活性を保持して血中に移行することが認められている。また同様に、インスリンをMLVリポソームに内封することにより、粘膜吸収の一つである経鼻吸収によるインスリンの吸収率向上の可能性がin vitro実験により示唆されている（Y.Maitani et al. Chem. Pharm. Bull. 40(6) 1569-1572 1992）。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】上述の上野らの報告によると90%のフォスファチジルコリンと10%のステアリルアミンより調製した正電荷を帯びたMLVリポソームにヘパリンを内封させることによりビーグル犬でのヘパリンの経口吸収に成功している。この報告において、ヘパリン注射時との吸収率の比較が記されていないため、正確に経口投与によるヘパリンの吸収率に関して言及することは不可能であるが、我々のヘパリンの静注時の結果から類推するとヘパリンの吸収率は約数%と考えられ、効率の良い吸収が達成されたとは言い難い。

【0004】上述の白根らはインスリンを封入したMLVリポソームをマウスに経口投与することにより、血糖値の降下を確認しているが、その降下作用は皮下注射のそれには及んでいない。

【0005】また、Yotsuyanagiらは、インスリンを封入したリポソームのラットへの経口投与を行ったが、インスリンの吸収を確認することができなかった。（Ann. Rept. Pharm. Nagoya City Univ. 31 1-17 1983）すなわち、一般的リポソームであるMLV、SUV、LUVを用いたこれらの方法においても、注射に比べて高投与量が必要なこと、また吸収が変動し易いこと等の難点があり、現在においてまだ完全な実用化には至っていない。

【0006】また、MVVリポソームは1983年にKimら

によりMLVではない新規なリポソームとして発表され (Biochim Biophys Acta 728 (3) 339-348 1983)、抗癌剤である5-FU (5-fluorouracil) の眼への投与 (Ophthalmic Surg 19(6) 408-413 1988) や、抗ウイルス剤であるDDC (2',3'-dideoxycytidine) の脳室内投与 (J Infect. Dis. 162(3) 750-752 1990) 等のキャリアーとしての利用例が報告されているが、ペプチド・蛋白質性薬物やワクチンの経口投与や経粘膜投与に用いられた報告はない。

【0007】本発明の目的は、ペプチド・蛋白質性薬物またはワクチンを経口または経粘膜投与するための、1枚膜リポソームおよび/または多重層リポソーム中に、ペプチド・蛋白質性薬物またはワクチンを含有する1以上の1枚膜リポソームおよび/または多重層リポソームを内封したリポソーム製剤を提供することにある。

【0008】更に本発明の目的は、ペプチド・蛋白質性薬物またはワクチンを経口または経粘膜投与により効率よく吸収させることのできる、1枚膜リポソームおよび/または多重層リポソーム中に、ペプチド・蛋白質性薬物またはワクチンを含有する1以上の1枚膜リポソームおよび/または多重層リポソームを内封したリポソーム製剤を提供することにある。

【0009】また、本発明の目的は、特にインスリン類、カルシトニン類、黄体形成ホルモン放出ホルモン類 (アゴニスト、アンタゴニスト含む) などのペプチド・蛋白質性薬物またはインフルエンザワクチンなどのワクチンを、経口投与または経粘膜投与により効率よく吸収させる、1枚膜リポソームおよび/または多重層リポソーム中に、これらペプチド・蛋白質性薬物またはワクチンを含有する1以上の1枚膜リポソームおよび/または多重層リポソームを内封したリポソーム製剤を提供することにある。

【0010】また更に、本発明の目的は、吸収促進剤の存在下でペプチド・蛋白質性薬物またはワクチンを経口または経粘膜投与により、極めて効率よく吸収させることのできる、1枚膜リポソームおよび/または多重層リポソーム中に、ペプチド・蛋白質性薬物またはワクチンを含有する1以上の1枚膜リポソームおよび/または多重層リポソームを内封したリポソーム製剤を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、ペプチド・蛋白質性薬物およびワクチンに関し、経口投与または経粘膜投与により効率よく吸収させる方法について鋭意検討した結果、驚くべきことに、リポソームの種類としては従来のMVVリポソームに類似するが、MVVリポソームの中身を油相から水相に変えることにより、すなわち、薬物を内封した1枚膜リポソームおよび/または多重層リポソームを1以上、それよりも大きな1枚膜リポソームおよび/または多重層リポソームに内封するリ

ポソーム製剤を用いることにより、ペプチド・蛋白質性薬物またはワクチンを経口・経粘膜投与した場合に、更に効率よく吸収されることを見だし、本発明に至った。

【0012】すなわち、本発明は、1枚膜リポソームおよび/または多重層リポソーム (外皮リポソーム) 中に、1以上の1枚膜リポソームおよび/または多重層リポソーム (内封リポソーム)、および必要に応じて吸収促進剤を含み、かつ内封リポソーム中にペプチド・蛋白質性薬物またはワクチンを含んでなる経口投与または経粘膜投与用リポソーム製剤に関する。

【0013】本発明において、ペプチド・蛋白質性薬物としては、カルシトニン類、インスリン類、グルカゴン、成長ホルモン、成長ホルモン放出ホルモン類、ソマトスタチン類、成長ホルモン放出因子、エンケファリン類、黄体形成ホルモン放出ホルモン類、インスリン様成長因子類、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、パゾプレッシン類、心房性ナトリウム利尿ペプチド、インターフェロン類、インターロイキン類、エリスロポエチン、顆粒球コロニー形成刺激因子、マクロファージ形成刺激因子、副甲状腺ホルモン類、副甲状腺ホルモン放出ホルモン、オキシトシン、プロラクチン、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモンよりなる群から選ばれる1種以上のペプチド・蛋白質性薬物を挙げることができる。

【0014】カルシトニンは、体内のカルシウム代謝を調節しているペプチドホルモンであり、カルシウムの骨吸収を阻害し、かつ腎臓から排出されるカルシウムを再吸収させる働きを有する。その種類として、天然のものとしてサケカルシトニン、ウナギカルシトニン、ヒトカルシトニン、ブタカルシトニン、ニワトリカルシトニン、ウシカルシトニン、ヒツジカルシトニン、ラットカルシトニンが知られており、またそれらの合成誘導体としてエルシトニン等も知られている。本発明に於いては、カルシトニン類としてこれらのカルシトニン及びそれらの誘導体のいずれをも用いることができる。

【0015】インスリンは、ランゲルハンス島のB細胞内で生合成され、血中に分泌されるホルモンであり、糖 (グルコース、ガラクトース等) の膜透過の促進作用や糖利用の促進作用などにより血糖値をコントロールする働きを有する。その種類として、ヒト、ブタ、ウシ、イヌ、ウサギ、ウマ、ヒツジ、ラットなどのインスリンが知られている。本発明に於いては、インスリン類としてこれらのインスリンのいずれをも用いることができる。

【0016】副甲状腺ホルモン (PTH) とは、副甲状腺より分泌され、血清CaおよびP濃度を正常に維持する働きを有する。ウシ、ヒト、ブタ、ラットのものが知られ、アミノ酸残基84からなるペプチドである。またその誘導体として、C末端のアミノ酸を取り除いた、N端からの34ヶのアミノ酸残基で構成されたPTH(1-34)などが知られている。本発明に於いては、副甲状腺ホ

ルモン類としてこれらの副甲状腺ホルモン及びそれらの誘導体のいずれをも用いることができる。

【0017】成長ホルモン放出ホルモン（GHRH）とは、哺乳類の下垂体前葉に作用して成長ホルモンを放出させる43～44のアミノ酸残基からなるペプチドであり、ヒト、ラット、ヒツジ、ウシ、ブタのものが知られている。またその誘導体として、C末端のアミノ酸を取り除いた、N端からの29ヶのアミノ酸残基で構成されたGHRH(1-29)-NH<sub>2</sub>などが知られている。本発明に於いては、成長ホルモン放出ホルモン類としてこれらの成長ホルモン放出ホルモン及びその誘導体のいずれをも用いることができる。

【0018】黄体形成ホルモン放出ホルモン（LHRH）とは、脊椎動物の下垂体前葉のGTH細胞に作用してLHおよびFSHを放出させるペプチドであり、ヒト、ブタ、ニワトリ、サケ、ウナギのものが知られている。またその誘導体として[D-Ser(t-Bu)<sup>6</sup>, des-Gly<sup>10</sup> ethylamide]LHRH、[D-Ala-3(2-naphtyl)<sup>6</sup>]LHRH、[D-Leu<sup>6</sup>, des-Gly<sup>10</sup> ethylamide]LHRH、[D-Ser(t-Bu)<sup>6</sup>, aza-Gly<sup>10</sup>]LHRHなどのスーパーアゴニストや[N-Ac-D-Nal(2)<sup>1</sup>, D-pPhe<sup>2</sup>, D-Pal(3)<sup>3</sup>, Lys(Nic)<sup>5</sup>, D-Lys(Nic)<sup>6</sup>, Lys(iPr)<sup>8</sup>, D-Ala<sup>10</sup>]LHRHなどのアンタゴニストが知られている。本発明に於いては、黄体形成ホルモン放出ホルモン類としてこれらの黄体形成ホルモン放出ホルモン及びその誘導体のいずれをも用いることができる。

【0019】本発明のペプチド・蛋白質性薬物のうち、上記カルシトニン類、インスリン類、PTH類、GHRH類、LHRH類以外のものについても同様に、従来公知の天然由来、化学的若しくは遺伝子工学的に得られるもの及びそれらの合成若しくは一部アミノ酸が置換、挿入、削除等された誘導体が含まれる。

【0020】本発明においてワクチンとはインフルエンザワクチン、ジフテリアワクチン、破傷風ワクチンまたは百日咳ワクチンよりなる群から選ばれる1種以上のペプチド・蛋白質性薬物を挙げることができる。

【0021】本発明において、ペプチド・蛋白質性薬物またはワクチンの量は、治療有効量であり、それぞれのペプチド・蛋白質性薬物またはワクチンにより固有の量である。治療有効量としては、通常、それぞれのペプチド・蛋白質性薬物またはワクチンが注射投与において用いられる量の同量～20倍量であることが好ましく、特に好ましくは、2倍量～10倍量である。

【0022】本発明において、吸収促進剤としては、例えば、EDTA等のキレート剤、ジメチル-β-シクロデキストリン等のシクロデキストリン類、カプリン酸ナトリウム等の飽和／不飽和脂肪酸類ならびにそれらの塩、飽和／不飽和脂肪酸アルコールやそれらのアルキルエステル類、蛋白分解酵素阻害剤等の経口投与用製剤または経粘膜投与製剤において従来用いられている公知のものを用いることができる。本発明の吸収促進剤は外皮

リボソーム中に内封リボソームと共に存在せしめることが好ましいが、更に内封リボソーム中に存在せしめることもできる。

【0023】本発明において、蛋白分解酵素阻害剤としては例えばトリプシンまたはキモトリプシンによる蛋白分解を阻害するものであればいかなるものでも良い。すなわちセリンプロテアーゼに対する阻害剤も当然その中に含まれる。またアミノペプチダーゼに対する阻害剤の使用も可能である。特にトリプシンインヒビター、キモトリプシンインヒビター、さらにはアミノペプチダーゼインヒビターを組み合わせることにより、本発明のリボソーム製剤による、さらなる効率の良い経口投与が可能となる場合がある。それら蛋白分解酵素阻害剤の例としては、アプロチニン、大豆トリプシンインヒビター、ジャガイモI・II型インヒビター、膵臓分泌トリプシンインヒビター、α2マクログロブリン、ロイペプチン、キモスタチン、エラスタチナール、ベンズアミジン、アミノカプロン酸、トラネキサム酸、メシル酸ガベキサート、メシル酸カモスタット、メシル酸ナファモスタット、DFP (diisopropyl fluorophosphate)、PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)、TPCK (tosylamino phenylethyl chloromethyl ketone)、α1アンチトリプシン、α1アンチキモトリプシンなどが挙げられる。なかでも好ましくは、アプロチニン、α2マクログロブリン、キモスタチン、メシル酸ガベキサート、メシル酸カモスタット、メシル酸ナファモスタットが挙げられる。

【0024】本発明において、蛋白分解酵素阻害剤の量は、リボソーム内に内封されたペプチド・蛋白質製薬物の量に影響され、通常、リボソーム内に内封されたペプチド・蛋白質製薬物の量の同量～100倍量であることが好ましく、特に好ましくは、10倍量～50倍量である。

【0025】本発明のリボソーム製剤は、例えば（A）薬物を内封した内封リボソームの製造、（B）内封リボソームを内封した外皮リボソームの製造、という2つの工程により製造される。工程（A）においてはあらゆる公知の技術が採用される。工程（B）においては、例えばガラスフィルターによる製造法が採用される。

【0026】該工程（A）の製造法としては例えば以下のようなものが挙げられる。

【0027】（1）フラスコ中においてリン脂質溶液の溶媒を蒸発除去し、リン脂質の薄膜とし、膜状リン脂質をペプチド・蛋白質性薬物またはワクチン含有水溶液を用いてハイドレーションに付し、まずペプチド・蛋白質性薬物またはワクチンを含有するMLV（又はMLV及びOLV；以下同様）リボソームを得る。このMLVリボソームが本発明の製剤中の内封リボソームの1例に相当する。さらに、このMLVを超音波振とう機で振とうすることによりSUVリボソームを得ることができ

る。このSUVリボソームもまた、本発明の製剤中の内封リボソームの1例に相当する。

【0028】(2) フラスコ中においてリン脂質溶液の溶媒を蒸発除去し、リン脂質の薄膜とし、膜状リン脂質をペプチド・蛋白質性薬物またはワクチン含有水溶液を用いてハイドレーションに付し、まずペプチド・蛋白質性薬物またはワクチンを含有するMLVリボソームを得る。このMLVリボソームが本発明の製剤中の内封リボソームの1例に相当する。さらに、このMLVをフレンチプレスに入れ、20,000lbs/in<sup>2</sup>で押し出すとMLVを  
10 含んだ不均一なSUVが生成される。このフレンチプレスによる押し出しを、少なくとも4回以上繰り返すことにより均一なSUVが生成される。このSUVリボソームもまた、本発明の製剤中の内封リボソームの1例に相当する。

【0029】(3) リン脂質のエタノール溶液をシリンジを通じて、ペプチド・蛋白質性薬物またはワクチンを溶解した水溶液中に注入することにより、ペプチド・蛋白質性薬物またはワクチンを含有するSUVリボソーム  
20 を得ることができる。このSUVリボソームも本発明の製剤中の内封リボソームの1例に相当する。

【0030】(4) 直径29mm、厚さ4mm、孔径10～16μmのガラスフィルター中でリン脂質溶液を含浸させ、室温で窒素を流通させることにより溶媒を除去し、ペプチド・蛋白質性薬物またはワクチン含有水溶液を加え、用いたリン脂質の相転移温度以上の温度で10分間水とさせる。その後30分間超音波処理し、ガラスフィルターの両端にシリンジを装着し、残余の緩衝液をフィルター内に急速に通過させることにより、ペプチド・蛋白質性薬物またはワクチンを含有するSUVリボソーム  
30 を調製することができる。このSUVリボソームも本発明の製剤中の内封リボソームの1例に相当する。

【0031】該工程(B)の製造法としては、例えば直径30mm、厚さ5mm、孔径40～100μmのガラスフィルター中でリン脂質溶液を含浸させ、室温で窒素を流通させることにより溶媒を除去し、工程(A)で調製した、ペプチド・蛋白質性薬物またはワクチン内封のSUVリボソームおよび／またはMLVリボソームの懸濁水溶液を加える。なお必要に応じて加える吸収促進剤は、この懸濁水溶液中に添加しておくのがよい。つぎに、用いたリン脂質の相転移温度以上の温度で10分間水とさせる。その後30分間超音波処理し、ガラスフィルターの両端にシリンジを装着し、残余の緩衝液をフィルター内に急速に通過させることにより、本発明である、1枚膜リボソームおよび／または多重層リボソーム(外皮リボソーム)中に、1つ以上の1枚膜リボソームおよび／または多重層リボソーム(内封リボソーム)、および必要に応じて吸収促進剤を含み、かつ内封リボソーム中にペプチド・蛋白質性薬物またはワクチンを含んでなる経口、経粘膜投与用リボソーム製剤を得ることができる。  
40 50

【0032】このようにして得られる本発明のリボソーム製剤において、ペプチド・蛋白質性薬物またはワクチンは内封リボソーム中にのみ含有されていることが望ましいが、前述した本発明の目的の範囲内で内封リボソーム膜中及び／又は外皮リボソームの水相内、膜中に存在していても良い。

【0033】本発明のリボソーム製剤は経口、経粘膜投与用製剤として適用されるが、そのような粘膜としては、口腔粘膜、鼻粘膜、腔粘膜、子宮粘膜、直腸粘膜等を挙げることができ、これらのなかでも粘膜としては鼻粘膜、腔粘膜を好ましいものとして挙げることができる。

【0034】本発明のリボソーム製造の際に用いられるリン脂質としては、自体公知なものが使用可能であり、その例としては、卵黄レシチン、大豆レシチン、フォスファチジルコリン、フォスファチジルエタノールアミン、フォスファチジルセリン、フォスファチジルグリセロール、スフィンゴミエリン、リゾフォスファチジルコリン、フォスファチジン酸などの天然もしくは合成のリン脂質、水素添加リン脂質もしくはグリセロフォスフォグリセロ糖脂質などが挙げられる。これらのリン脂質は単一でも良くまた2種以上のものを混合して使用しても良い。

【0035】本発明のリボソーム製剤には、これらリン脂質の他に添加剤として膜安定化剤のコレステロールなどのステロール類、抗酸化剤としてトコフェロールなど、また荷電物質としてステアリアルアミン、ジセチルフォスフェート、ガングリオシドなどを添加しても良い。

【0036】本発明のリボソーム製剤は、上記のようなリン脂肪の組み合わせ、更に必要に応じて他の添加剤との組み合わせからなるが、これらの組み合わせのなかでも、大豆レシチン、フォスファチジルセリンからなる群より選ばれるリン脂質からなるリボソーム製剤、及び大豆レシチン、水素添加大豆レシチン、フォスファチジルセリンからなる群より選ばれるリン脂質とステアリアルアミン等の荷電物質からなるリボソーム製剤を好ましいものとして挙げることができる。

【0037】またこれら本発明のリボソーム製剤において、内封リボソームとしては1枚膜および／または多重層リボソームなかでも1～数個の1枚膜リボソームが好ましく、外皮リボソームとしては1枚膜および／または多重層リボソームのなかでも1枚膜リボソームを好ましいものとして挙げることができる。かかる好適例の内封及び外皮リボソームにおいて、リン脂質、添加剤、ペプチド・蛋白質性薬物またはワクチン、吸収促進剤等との好ましい組み合わせとしては、上述のリン脂質～吸収促進剤等の好適例との組み合わせを挙げることができる。

【0038】本発明のリボソーム製剤に内封される薬物は水溶液状であり、この水溶液は、リン酸、酢酸、クエン酸などの緩衝液を構成する物質、塩化ナトリウム、グ

ルコース、グリセリン等の等張化剤、トコフェロール、グルタチオン等の抗酸化剤、クロルブタノール、パラベン等の防腐剤、アルブミンなどの安定化剤などを加えたものを用いても良い。

【0039】本発明のリポソーム製剤は、通常以下のような投与方法により投与される。すなわち、経口投与製剤として用いる場合には、得られたリポソーム溶液をそのまま用いるか、濃厚なリポソームとして用時、分散液で分散して用いる方法などがある。また、可能であるならば、凍結乾燥し、そのまま、または用時再分散して用

【0040】経粘膜投与製剤として用いる場合には、得られたリポソーム溶液をスプレー容器やシリンジにいれ、粘膜部位に噴霧もしくは滴下する方法などがある。また、凍結乾燥できた場合には、用時溶解し、スプレー容器やシリンジにいれ、粘膜部位に噴霧もしくは滴下する方法などがある。さらには、凍結乾燥粉体をそのままカプセルに充填し、専用のスプレー器具にセットし、針を貫通させ、それによりカプセル上下に微小な孔をあけ、次いで空気をゴム球等で送りこんで粘膜部位に噴出させる方法などがある。

【0041】本発明により、ペプチド・蛋白質性薬物またはワクチンを効率よく経口または経粘膜投与できるリポソーム製剤を提供することは、医療上その価値は大である。

#### 【0042】

【実施例】以下に実施例を挙げ、本発明を詳述するが、これは本発明を説明するために記載するものであって、本発明を限定するものではない。

\*

#### 実施例1～6のリポソーム製剤の組成

	実施例1	実施例2	実施例3	実施例4	実施例5	実施例6
水素添加大豆レシチン	26 $\mu$ M	26 $\mu$ M	26 $\mu$ M	26 $\mu$ M	26 $\mu$ M	26 $\mu$ M
ステアリン酸	-	-	2.6 $\mu$ M	-	-	-
フォスファチジルセリン	-	-	-	2.6 $\mu$ M	-	-
インスリン	1mg	1mg	1mg	-	-	-
サケカルシトニン	-	-	-	1mg	1mg	1mg
アプロチニン	-	100U	-	-	-	100U
キモスタチン	-	-	-	-	0.5mg	0.5mg

【0047】【対照例1～6】下記表2に記した組成のSUVリポソームをガラスフィルターにより調製した。すなわち、下記の脂質を組成通りにクロロホルムに溶解し、直径29mm、厚さ4mm、孔径10～16 $\mu$ mのガラスフィルターに含浸させた後、室温で窒素を流通させて完全に溶媒を留去させた。これにインスリンまたはサケカルシトニンを溶解させたpH7.4のリン酸緩衝液を加え、水素添

※加大豆レシチンの相転移温度以上で10分間水和させ、その後30分間超音波処理した。ついでガラスフィルターの両端にシリンジを装着し、pH7.4のリン酸緩衝液(PBS)をフィルター内に急速に通過させ、目的とするSUVリポソーム製剤(対照例1～6)を調製した。

#### 【0048】

#### 【表2】

\*【0043】【実施例1～6】下記表1に記した組成のリポソームをガラスフィルターにより調製した。

【0044】(1)すなわち、表1記載の脂質を組成通りにクロロホルムに溶解し、直径29mm、厚さ4mm、孔径10～16 $\mu$ mのガラスフィルターに含浸させた後、室温で窒素を流通させて完全に溶媒を留去させた。これにインスリンまたはサケカルシトニンを溶解させたpH7.4のリン酸緩衝液を加え、水素添加大豆レシチンの相転移温度以上で10分間水和させ、その後30分間超音波処理した。ついでガラスフィルターの両端にシリンジを装着し、pH7.4のリン酸緩衝液(PBS)をフィルター内に急速に通過させ、薬物を内封する内封リポソームを調製した。

【0045】(2)(1)と同様の組成の脂質を直径30mm、厚さ5mm、孔径40～100 $\mu$ mのガラスフィルターに含浸させた後、室温で窒素を流通させて完全に溶媒を留去させた。これに(1)で調製した内封リポソーム、pH7.4のリン酸緩衝液もしくはアプロチニンおよび/またはキモスタチンを溶解させたpH7.4のリン酸緩衝液を加え、水素添加大豆レシチンの相転移温度以上で10分間水和させ、その後30分間超音波処理した。ついでガラスフィルターの両端にシリンジを装着し、PBSをフィルター内に急速に通過させ、本発明に用いるリポソーム製剤を調製した。かくして得られたリポソーム製剤は外皮リポソームとしてのLUV中に、内封リポソームとして1～数個のSUVを含有していることが確認された。

#### 【0046】

#### 【表1】



## 対照例1～6のリボソーム製剤の組成

	対照例1	対照例2	対照例3	対照例4	対照例5	対照例6
水素添加大豆レシチン	26 $\mu$ M	26 $\mu$ M	26 $\mu$ M	26 $\mu$ M	26 $\mu$ M	26 $\mu$ M
ステアリン酸	-	-	2.6 $\mu$ M	-	-	-
フォスファチジルセリン	-	-	-	2.6 $\mu$ M	-	-
インスリン	1mg	1mg	1mg	-	-	-
サケカルシトニン	-	-	-	1mg	1mg	1mg
γ-グロチニン	-	100U	-	-	-	100U
キモスタチン	-	-	-	-	0.5mg	0.5mg

【0049】〔実施例7～9〕実施例7として実施例1で調製したインスリン封入リボソームをPBSに分散させ、インスリン量約20IU/kgとなるように、16時間絶食させた雄性ラット（Wistar系、体重：180～200g）にゾンデにより強制的に経口投与した。また実施例8として実施例2で調製したリボソームを、実施例9として実施例3で調製したリボソームを同様に投与した。一定時間後に頸静脈より採血し、血清中のグルコース濃度をグルコースB-testキット（和光純薬工業（株））を用い

て、グルコースオキシダーゼ法にて測定した。  
【0050】同時に比較として、対照例7～10を実施した。対照例7として対照例1で調製したリボソームを、対照例8として対照例2で調製したリボソームを、また対照例9として対照例3で調製したリボソームを各々実施例1～3と同様な条件でラットに経口投与した。また、対照例10は非投与時のラットの例である。

【0051】得られた結果を図1に示した。

【0052】図1から、本発明のリボソーム製剤（実施例7、8、9の製剤）は、従来のリボソーム製剤（対照\*30

\*例7、8、9の製剤）に比較して、経口投与後の血糖値を有意に低下させることが判る。すなわち本発明は、従来の技術に比し封入したインスリンを効率よく体内に吸収させていることが示された。

【0053】〔実施例10〕実施例10として実施例6で調製したサケカルシトニン封入リボソームをPBSに分散させ、カルシトニン量約500IU/kgとなるように、16時間絶食させた雄性ラット（Wistar系、体重：180～200g）にゾンデにより強制的に経口投与した。一定時間後に頸静脈より採血し、血漿中のカルシトニン濃度をRIA法にて測定した。

【0054】同時に比較として、対照例11ならびに対照例12を実施した。対照例11として対照例4で調製したリボソーム製剤を、対照例12として対照例6で調製したリボソーム製剤を、各々実施例10と同様な条件でラットに経口投与した。

【0055】得られた結果を表3に示した。

【0056】

【表3】

血中サケカルシトニン濃度（pg/ml）の経時変化

時間（分）	0	15	30	60	90	AUC
対照例11	0	8	12	8	0	10.5
対照例12	0	10	15	8	0	12.1
実施例10	0	36	52	28	12	45.5

【0057】表3から、本発明のサケカルシトニン含有経口投与用リボソーム製剤（実施例10）によるサケカルシトニンの吸収量は、対照例11に比べ約4.3倍、対照例12に比べ3.8倍（AUC；pg・h/ml）を示し、その吸収率、持続性の点に優れていることが判る。

【0058】〔実施例11〕実施例11として実施例4で調製したサケカルシトニン封入リボソーム製剤をPBSに分散させ、カルシトニン量約200IU/kgとなるように、16時間絶食させた雌性ラット（Wistar系、体重：18※

※0～200g）の膈粘膜に投与した。一定時間後に頸静脈より採血し、血漿中のカルシトニン濃度をRIA法にて測定した。

【0059】同時に比較として、対照例13を実施した。対照例13として対照例4で調製したリボソーム製剤を実施例11と同様な条件でラットの膈粘膜に投与した。

【0060】得られた結果を表4に示した。

【0061】

【表4】



血中サケカルシトニン濃度 (pg/ml) の経時変化

時間 (分)	0	15	30	60	90
対照例 13	0	48	32	15	0
実施例 11	0	67	85	43	21

【0062】表4から、本発明のサケカルシトニン含有経粘膜投与用リボソーム製剤（実施例11）は対照例に比べ、その吸収率、持続性に優れていることが判る。

【0063】〔実施例12〕実施例12として実施例5で調製したサケカルシトニン封入リボソーム製剤をPBSに分散させ、カルシトニン量約200IU/kgとなるように、16時間絶食させた雄性ウサギ（Japanese White系、体重：2.5～3.5kg）の鼻腔内に噴霧与した。一定時間後に耳静脈より採血し、血漿中のカルシトニン濃度をRIA法にて測定した。

【0064】同時に比較として、対照例14、15を実\*

\*施した。対照例14として対照例5で調製したリボソーム製剤を実施例12と同様な条件でウサギの鼻腔内に投与した。

【0065】さらに対照例15（水溶液）としてサケカルシトニンの酢酸バッファー溶液をカルシトニン量約200IU/kgとなるように実施例12と同様な条件でウサギの鼻腔内に投与した。

【0066】得られた結果を表5に示した。

【0067】

【表5】

血中サケカルシトニン濃度 (pg/ml) の経時変化

時間 (分)	0	15	30	60	90
対照例 14	0	58	52	28	12
対照例 15	0	15	8	0	0
実施例 12	0	98	120	63	35

【0068】表5から、本発明のサケカルシトニン含有経粘膜投与用リボソーム製剤（実施例12）は対照例に比べ、吸収率、持続性の点で優れていることが判る。

【0069】〔実施例13～18〕下記表6に記した組成のリボソームをガラスフィルターにより調製した。

【0070】（1）すなわち、表6記載の脂質を組成通りにクロロホルムに溶解し、直径30mm、厚さ5mm、孔径40～100μmのガラスフィルターに含浸させた後、室温で窒素を流通させて完全に溶媒を留去させた。これに表6記載ペプチド・蛋白質性薬物を溶解させたpH7.4のリン酸緩衝液を加え、水素添加大豆レシチンの相転移温度以上で10分間水和させ、その後30分間超音波処理した。ついでガラスフィルターの両端シリンジを装着し、pH7.4のリン酸緩衝液をフィルター内に急速に通過させ、表6記載のペプチド・蛋白質性※

※薬物を封入したリボソームを調製した。

【0071】（2）（1）と同様の組成の脂質を直径30mm、厚さ5mm 孔径40～100μmのガラスフィルターに含浸させた後、室温で窒素を流通させて完全に溶媒を留去させた。これに、（1）で調製した内封リボソーム、そしてpH7.4のリン酸緩衝液もしくはメシル酸ガベキサートを溶解させたpH7.4のリン酸緩衝液を加え、水素添加大豆レシチンの相転移温度以上で10分間水和させ、その後30分間超音波処理した。ついでガラスフィルターの両端にシリンジを装着し、pH7.4のリン酸緩衝液をフィルター内に急速に通過させ、本発明に相当するリボソーム製剤を調製した。

【0072】

【表6】

実施例13～18のリボソーム製剤の組成

	13	14	15	16	17	18
水素添加大豆レシチン	26μM	26μM	26μM	26μM	26μM	26μM
メシル酸ガベキサート	-	5mg	-	4mg	-	5mg
酢酸リューフ・ロライト*	1mg	1mg	-	-	-	-
酢酸ソマトレイン	-	-	1.2mg	1.2mg	-	-
PTH(1-34)	-	-	-	-	1mg	1mg

\* 酢酸リューフ・ロライト\*はLHRHの誘導体、酢酸ソマトレインはGHRH1-29である。

【図面の簡単な説明】

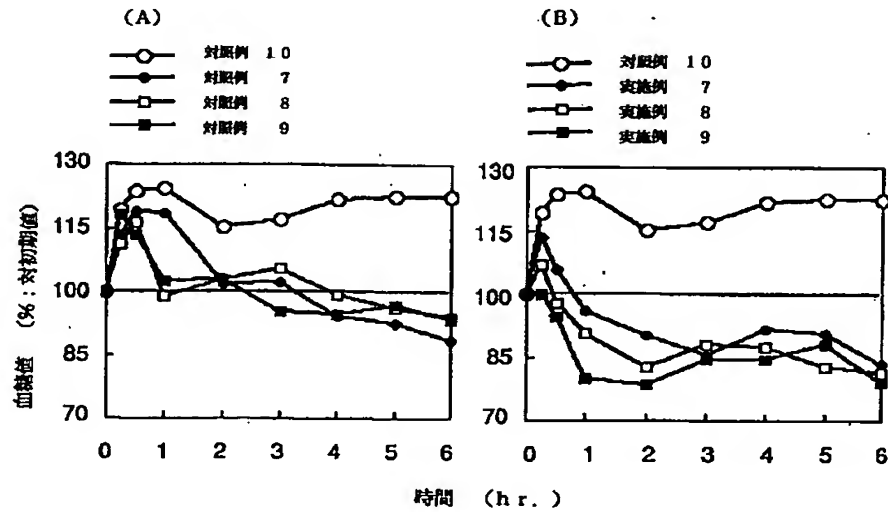
【図1】図1は、インスリン封入リボソーム製剤（実施例7～9、対照例7～10）をラットに経口投与した場

合の血清グルコース濃度の測定結果を示す。図1（A）は対照例7～10のリボソーム製剤を投与した結果を示し、白丸は対照例10、黒丸は対照例7、白角は対照例

8、黒角は対照例 9 を示している。また図 1 (B) は実施例 7 ~ 9、対照例 10 のリボソーム製剤を投与した結

\* 果を示し、白丸は対照例 10、黒丸は実施例 7、白角は実施例 8、黒角は実施例 9 を示している。

【図 1】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>6</sup>

A 6 1 K 9/127

38/00

38/28

38/26

38/23

38/11

38/27

38/04

38/21

39/00

47/20

47/42

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

V

G

E

E

A 6 1 K 37/24

37/26

37/28

37/30

37/34

37/36

37/43

37/66

H